

論文の内容の要旨

氏名：奥 寺 紀 智

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Ionomycin が vesicular stomatitis virus glycoprotein の小胞体—ゴルジ体間のタンパク質輸送に与える影響

ヒトの細胞では、細胞質におけるカルシウムの濃度と小胞体やミトコンドリアなどの細胞内小器官におけるそれとでは大きな違いがあることが知られている。小胞体内のカルシウムイオンの約 50% は inositol 4, 5-bisphosphate の作用により放出されるが、残りのカルシウムイオンは calcium ionophore によってのみ強制的に放出しうることが知られており、これにより小胞体内のタンパク質は速やかに分泌される。これらの事実は、小胞体からのタンパク質輸送がカルシウムイオン濃度に大きく依存していることを示すものである。

Vesicular stomatitis virus glycoprotein (VSV-G) は小胞体—ゴルジ体間のタンパク質輸送に関する研究で多用されてきた膜貫通型の I 型糖タンパク質である。VSV-G は小胞体内で正しく折りたたまれ、3 量体を形成したのちに小胞体から輸送される。正しく折りたたまれなかった VSV-G はプロテオソームでの分解を受けることから、このシステムは、タンパク質の品質管理システムと呼ばれている。このシステムにおいて最も重要な機能を果たすものがシャペロン分子である。シャペロン分子は小胞体内で折りたたまれる前のタンパク質に結合し、立体構造が不正な分子の産生を阻止するとともに、正しい構造を形成した分子からは解離しこれを分泌させる。従って、タンパク質の小胞体における品質管理に主体的な役割を演じているといえる。

小胞体において VSV-G と結合するシャペロン分子は immunoglobulin heavy chain binding protein (BiP) と calnexin であり、この結合にはカルシウムイオンが極めて重要と考えられているが、小胞体内のカルシウムイオンの強制的な放出と VSV-G のゴルジ体への輸送については詳細な報告はない。そこで本研究では、calcium ionophore である ionomycin の小胞体—ゴルジ体間の VSV-G 輸送に対する影響について検討することとした。

研究には baby hamster kidney (BHK) 細胞とヒト線維芽細胞 HeLa を用いた。これらの細胞に recombinant vaccinia virus を用いて VSV-G plasmid の transfection を行い、transfection 後の細胞を、Tran-³⁵S-label (MP Biomedicals, Aurora, OH) により metabolic labeling した。この細胞を培養し、経時的な VSV-G の糖鎖修飾の違いを免疫沈降法とこれに続く endoglycosidase H による消化実験により検出することで VSV-G の輸送の状況について観察した。また、ionomycin の影響については細胞を ionomycin 存在下または非存在下に培養し、同様の方法で検討した。シャペロン分子との結合状態の検討は、免疫沈降実験と Western blot 法を用いて行った。さらに、VSV-G の細胞内輸送状況の形態学的な観察は、VSV-G の温度感受性変異体である tsO45 に green fluorescence protein (GFP) を標識し、これを transfection することにより観察した。

その結果、ionomycin は両細胞における小胞体—ゴルジ体間の VSV-G 輸送を濃度依存的に阻害し、ionomycin 濃度 5 μ M において、約 50% の阻害効果が得られた。この効果が、VSV-G 分子の細胞質ドメインに依存した効果であるか否かについて、細胞質ドメインを欠失した mutant を用いて同様に検索したところ、wild type VSV-G と比較して輸送効率は顕著に抑制されたものの、ionomycin による阻害効果は同様に観察された。また、細胞外からのカルシウムイオンの流入の影響を確認するために細胞培養液中に 5 mM EGTA を添加して実験したところ、ionomycin と 5 mM EGTA 共存下で VSV-G 輸送は完全に抑制された。さらに、calnexin と VSV-G の結合状況に対する ionomycin の影響を観察したところ、BHK 細胞においては VSV-G と calnexin との結合には ionomycin は影響せず、約 20 分後に VSV-G は完全に calnexin から分離していたのに対し、HeLa 細胞においては ionomycin の濃度と培養時間に依存して両者の結合が遷延することが確認された。以上の実験結果をもとに、BHK 細胞における immunoglobulin joining chain (J-chain) の輸送に与える ionomycin の影響についても同様の

手法を用いて検討した。その結果、ionomycin 存在下では、通常は細胞内にとどまるべき J-chain が細胞外に放出されることが明らかとなった。このように、ionomycin によるタンパク質輸送への影響は、輸送されるタンパク質の種類によっても異なることが分かった。

以上の結果から、ionomycin によるカルシウムイオンの小胞体からの強制的な放出が、小胞体—ゴルジ体間のタンパク質輸送に細胞種ごとに、また輸送されるタンパク質の種類により異なった影響を与えることが明らかになった。本研究で得られた成果は、カルシウムイオンの細胞生物学的な重要性を改めて確認したという意味で極めて意義深いものである。